

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶

C12N 9/02

C12N 9/96

(11) 공개번호 독2000-0005196

(43) 공개일자 2000년01월25일

(21) 출원번호	10-1998-0707872		
(22) 출원일자	1998년10월01일		
번역문제출일자	1998년10월01일		
(86) 국제출원번호	PCT/FR1997/00603	(87) 국제공개번호	WO 1997/38095
(86) 국제출원출원일자	1997년04월03일	(87) 국제공개일자	1997년10월16일
(81) 지정국	EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴		
	국내특허 : 아일랜드 일본		
(30) 우선권주장	1996-4165 1996년04월03일 프랑스(FR)		
(71) 출원인	쾨티카 드빅토르 피에르		
	프랑스 69007 리용 32 쿼 생 장 드 뒤		
(72) 발명자	브레송-리발 열핀		
	프랑스 69007 리용 25 비스 쿼 살르멜 라쿠르		
	브와벵 파트릭		
	프랑스 54850 메생 13 쿼 데 에망		
	랭랭 기		
	프랑스 54180 에일레꾸르 21 플라스 생 말로		
	페리에-에릭		
	프랑스 38138 레 꼬페 다레이 까르피에 생 마르탱		
	웜베르 제라르		
	프랑스 54140 자르빌 라 알그랑쥐 11 쿼 줄 발레리		
(74) 대리인	서종완		

실시예 : 없음

(54) 복합체 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 생성물

요약

슈퍼옥사이드 디스뮤타제, 또는 SOD가 개시된다. 슈퍼옥사이드 디스뮤타제의 원료로서 발아된 식물종자가 본 발명에 따라 사용되며, 이것은 이후 퍼옥시다제 및 효소 조인자와 복합체를 형성할 수 있다. 따라서, 항-유리 라디칼 활성을 갖는 화장품, 약품 또는 농-식품 조성물을 얻을 수 있다.

명세서

기술분야

본 발명은 SOD계-복합체 생성물, 그를 함유하는 화장품, 약품 및 식품 조성물 및 그 추출방법에 관한 것이다.

본 발명은 또한 발아된 식물 종자로부터 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(superoxide dismutase)를 추출/정제하는 방법, 및 그것이 H₂O₂-포획제(trapping agent), 특히 퍼옥시다제, 바람직하게는 그의 효소 조인자를 수반한 H₂O₂-포획제와 결합한 결합체를 추출/정제하는 방법에 관한 것이다. 이 효소 복합체는 매우 안정하며 조성물, 특히 화장품, 약품 또는 식품 조성물에 사용될 수 있다.

서론

좀 더 정확하게는 본 발명의 목적은 발아된 식물 종자, 즉 발아 단계를 겪은 식물 종자로부터 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(이하 "SOD"라 한다)를 얻는 것이며, 여기서 식물종자가 발아된 후 제조된 이 SOD는, 카탈라제 또는 퍼옥시다제와 같은 슈퍼옥사이드 디스뮤타제이션 반응(superoxide dismutation reaction)의 부산물, 주로 과산화수소(H₂O₂)를 파괴할 수 있는 다른 효소와 함께, 항-라디칼 조성물에 사용할 때 보다 우수한 안정성을 가질뿐만 아니라 높은 효소 활성을 갖는다. 따라서, 본 발명은 화장품 조성물, 약품 또는 피부병학 조성물, 또는 식품 조성물에 유리하게 사용된다.

유리 라디칼은 그들의 외각 오비탈에 쌍을 이루지 않은 전자를 갖는 원자 또는 분자들로 알려져 있다.

그들은 매우 불안정한 화합물로 가장 안정한 분자와 반응하여 그들의 전자가 쌍을 이룰 수 있다.

산소 유리 라디칼은 유기체내, 미토콘드리아내 또는 식세포 과정 중에 지속적으로 형성된다. 인간이 진화하는 환경뿐 아니라 자외선에의 노출과 같은 물리적 인자를 또한 생물학적 화합물 수준으로 유리 라디칼을 다량으로 제조하는 인자들이다. 이들 인자들에는 예를 들면, 자동차 오염, 담배, 이온화 방사 등이 있다.

산소 유리 라디칼은 분자 산소의 부분적 환원에 의해 형성된다. 산소에 의한 전자 포획은 슈퍼옥사이드 라디칼 $O_2^{\cdot -}$ 를 발생시키게된다. 이러한 음이온은 그렇게 반응적이지는 않으나 매우 반응적인 라디칼 종을 발생시킬 수 있다. SOD에 의한 슈퍼옥사이드 음이온의 효소적 디스뮤테이션은 과산화수소를 형성시켜 제1철의 존재하에서 펜톤 반응(Fenton reaction)을 하여 매우 반응적인 하이드록시 라디칼(OH^{\cdot})을 형성한다.

그들의 높은 반응성 때문에, 유리 라디칼들은 어떠한 세포 성분도 공격할 수 있고, 심각한 변형을 일으킬 수 있다; 피부에서, 유리 라디칼들, 특히 슈퍼옥사이드 음이온은 주된 목표로 올라겐뿐 아니라 엘라스틴 섬유, 글리코사미노글리칸 및 프로테오글리칸, 세포내 DNA, 세포막 인지질들도 공격한다.

올라겐과 엘라스틴 섬유는 형성된 유리 라디칼을 직접 포획하여 결과적으로 여러 가지 물괴를 일으킨다: 비특이적 프로테아제에 의해 붕괴된 펩타이드 사슬의 파괴 및 작은 펩타이드의 유리, 탄력성이 감소되는 사슬간 결합.

또한, 산소의 활성형을 파괴하는 효과를 억제하기 위하여, 모든 분자, 특히 화장품, 약품 또는 식품 분야에서 항-산화제계 조성물을 제조하는 것이 더욱더 필요해져 왔다. 화장품에 있어서, 해당 조성물들은 노화방지 제품으로 판매되고 알려져 있다.

배경기술

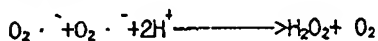
현재 화장품 또는 약품에 사용되는 항산화제는 유리 라디칼을 포획하는 화학 분자이거나, 실온에서조차 안정성이 매우 낮다는 것이 주된 단점인 효소계이다.

사용되는 친유성 포획자는 일반적으로 비타민 E 및 β -카로틴이며, 이들은 형성된 과산화물 라디칼을 환원시켜 지질 과산화로부터 그들을 보호하는 세포막 성분이다.

사용되는 친수성 항산화제는 일반적으로 수용성 매체내에서 슈퍼옥사이드와 하이드록시 라디칼에 대하여 반대작용을 하는 비타민 C로 구성되며, 또한 글루타티온 및 아연과 같은 효소 조인자로도 구성된다. 글루타티온은 항-라디칼 방어에 관련된 많은 효소(글루타티온 퍼옥시다제, 글루타티온 트랜스퍼라제 등의 효소)의 조인자인 반면 아연은 구리-아연 SOD의 조인자이다.

화장품 또는 약품에 사용되는 효소는 SOD이며, 이는 유기체와 피부 조직에 잠재적으로 해로운 슈퍼옥사이드 라디칼을 거의 순간적으로 확실하게 파괴하는 역할을 한다. SOD에 의해 촉매된 반응은 슈퍼옥사이드 음이온의 디스뮤테이션이며 다음 화학 반응식(1)에 따라 과산화수소를 생성한다.

반응식 1



여러 가지 효소가 슈퍼옥사이드 디스뮤타제의 물질효소로서 또한 알려져 있고 주로 밀 배아로부터 분리되며, 당업자는 보우챔프(Beauchamp)의 논문(published in the review Biochimica et Biophysica Acta, 1973, 317, 50-64)을 참고할 수 있다. 이 논문에서, 보우챔프(Beauchamp)는 3개의 SOD 효소를 분리했고, 그중 Mn SOD로 알려진 것은 알간에 대해 반응적이고 0.2mM 시안화물에 의해 저해되지는 않으나 클로로포름에 에탄올을 첨가한 것을 기본으로 한 쓰치하시(Tsuchihashi) 처리법에 의해 불활성화 되어, 게다가 다른 두 개의 Cu-Zn SOD형 SOD는 시안화물에 의해서는 저해되나 클로로포름과 에탄올을 첨가하여 사 용한 처리법으로는 영향을 받지 않는다고 보고했다. 후자 효소들은 프로토펙당 하나의 Cu^{+2} 이온과 하나의 Zn^{+2} 이온을 포함하여 30,000 달톤 정도의 분자량을 갖는다.

피부 조직에 존재하는 Cu-Zn SOD는 자외선에 의해 발생한 유리 라디칼에 대한 효소 방어의 최전방을 구성하는 것으로 생각된다. 그러나 자외선 방사 후 그 효소의 해당 잠재성이 매우 많이 감소되어 나타난다는 보고는 흥미롭다. 게다가, 이러한 보고로 말미암아 화장품학이나 약학 전문가들은 피부조직에 존재하는 자유 라디칼의 양을 감소시키기 위하여 조성물에 SOD를 포함시키게 되었다.

따라서 US-A-4,129,644 에서 로리알(L'Oréal)은 화장품 조성물과; 머리의 케라틴 구조를 유지하기 위한 처방(application)이나 SOD등의 투여에 의하여 머리와 피부를 보호하기 위한 처방을 포함하는 방법에 슈퍼옥사이드 디스뮤타제를 사용하는 것을 개시한 바 있다. 그 SOD는 소 혈액이나 다른 세균종(청구항 2-5)로부터 주로 얻어졌다.

로리알은 또한, W092/19224 에서, 여러가지 기원(동물, 인간, 세균, 효모 또는 생체과학)으로부터 제조된 SOD를 기초로 하여 국소 항-유리 라디칼 조성물 및 피부 노화를 방지하고 조사에 대한 피부 보호를 위한 금속-착물화제로서 인산 유도체를 개시한 바 있으며, 이들은, 특정 경우에 있어서, 금속의 불활성 인자와 착합체를 형성하는 특정화합물이 특정 하이드록시 라디칼(OH^{\cdot})의 생성을 줄일 수 있다는 증거를 근거로 하고 있다.

또한, FR-A-2 634 125 일본 문서로부터, SOD, 포스페이트, 염화알카리금속 및 슈크로오즈(청구항 참고)를 포함하는 안정화된 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 조성물이 알려져 있다. SOD는 사실상 인간 혈액에서 추출된다.

또한, FR-A-2 693 208 이노코즘 문서(Inocosc document)로부터, 밀 배아와 같은 곡류로부터 식물 SOD의 효소적 조성물을 얻는 방법으로서, 액체 알콜로 추출, 폴리아미드 또는 폴리비닐피롤리돈과 같은 고착제로 폴리페놀 제거, 세척 및 최종적으로 단백질 및 효소를 다시 액체 알콜로 추출하는 방법이 알려져 있다. 얻어진 SOD 활성은 매우 낮고 용매의 사용으로 SOD 추출물쪽 사용하기 어렵게 된다.

지금까지 산업용 SOD는 도살장에서 다량으로 이용할 수 있는 소 적혈구로부터 추출하여 얻어져 왔다.

한편, 보우첵프 등의 논문(Biochimica and Biophysica Acta, 1974, 317, pages 50-64)로부터 최소한, 밀 배아로부터 SOD를 추출한다는 것과 적어도 하나의 유사한 특허가 1992년에 이노코즘에 의해 출원(FR-A-2 963 208)되었다는 것이 알려져 있지만, 식물유래의 SOD 추출물의 양은, 한편으로는 곡류 배아내 SOD의 함량이 낮다는 점과, 다른 한편으로는 수율이 낮은 용매 매체로 추출하는 방법을 사용한다는 점 때문에, 매우 낮다는 것이 밝혀진 바 있다.

따라서, 본 발명의 주된 목적은 산업적 규모, 특히 화장품, 약품 또는 식품 분야에서 사용되기에 매우 우수한 수율로 다량의 식물유래의 SOD를 얻을 수 있게 하는 용액을 제공하는데 발생하는 새로운 기술적 문제를 해결하는 것이다.

본 발명은 또한 극히 활성적이고 또한 극히 안정한 식물유래의 SOD; 바람직하게는 실온에서 1개월(35일) 동안 그의 활성의 80%를 유지할 수 있고 45°C에서 50%의 활성을 유지할 수 있어 항-라디칼 조성물, 특히 화장품, 약품 또는 식품 제조사에 효과적으로 혼합될 수 있는 식물 유래의 SOD를 얻을 수 있게 하는 용액을 제공하는데 발생하는 새로운 기술적 문제를 해결하는 것을 목적으로 한다.

이들 모든 기술적 문제들은 본 발명에 의해 최초로 간단하고, 안전하며 신뢰성 있는 방법으로 해결되었으며, 이는 당업자에게 자명하지 않은 예기치 못한 기술적 결과들을 구성한다.

따라서, 첫 번째 태양에 따르면, 본 발명은 H_2O_2 -포획제(trapping agent), 유용하게는 퍼옥시다제, 바람직하게는 식물 퍼옥시다제, 더욱 바람직하게는 퍼옥시다제 특이적 환원 기질로 알려진 퍼옥시다제 조인자에 의해 안정화된 슈퍼옥사이드 디스뮤타제- 또는 SOD계 복합체 생성물에 관한 것이다.

SOD는 식물 유래의 SOD가 바람직하다.

한 구현예에 따르면, SOD는 발아 후의 식물 증자로부터 추출하여 얻어진다.

다른 구현예에 따르면, 이 식물 증자들은 곡류 낱알 또는 콩과 식물 증자 또는 유성 식물 증자이다.

본 발명의 문장내에서 용어 "증자"와 "낱알"은 동등하다.

곡류로는, 어느 곡류나 사용될 수 있으며, 특히 호밀, 옥수수, 밀 또는 보리, 바람직하게는 보리가 사용될 수 있고, 사용할 수 있는 여러 보리 품종들 가운데서도 롬 또는 겨울 품종들이 사용될 수 있다. 콩과 식물에 대해서는, 어느 콩과 식물 증자도 사용할 수 있으나 렌즈콩 또는 완두콩이 바람직하다. 유성 식물 증자에 대해서는, 어느 유성 식물 증자도 사용될 수 있으나 대두 식물 증자가 바람직하다.

다른 변형 실시예에서는, 상기 언급된 발아는 하루 또는 그 이상의 기간 동안 4~50°C의 온도, 유용하게는 실온에서 또는 차갑게 수성의 습한 배지 또는 대기에서, 바람직하게는 발아 촉진제의 존재하에서 수행됨으로써 조절된다.

또 다른 구현예에 따르면, H_2O_2 -포획제의 양은 사용된 SOD에 의해 형성된 H_2O_2 를 포획하기에 충분한 양이며, H_2O_2 -포획제가 퍼옥시다제일 때 퍼옥시다제의 양은 약 0.01~1 퍼옥시다제 유닛/SOD 유닛, 유용하게는 0.01~0.5 퍼옥시다제 유닛/SOD 유닛이다.

또 다른 구현예에 따르면, SOD와 H_2O_2 -포획제와의 복합체, 특히 퍼옥시다제와의 복합체는 0.0001~1M의 농도로 존재하는 효소 조인자, 특히 퍼옥시다제 효소 조인자에 의해 안정화된다.

또 다른 구현예에 따르면, 상기 언급된 퍼옥시다제는 양고추냉이(horseradish) 퍼옥시다제, 락토퍼옥시다제, 글루타티온 퍼옥시다제 또는 척추(spinal cord) 퍼옥시다제(또는 글루종-퍼옥시다제: myeloperoxidase)로 이루어진 군으로부터 선택되며, 퍼옥시다제 특이적 환원 기질은 글루타티온, 페놀, 구아니아졸, 피로갈록, 메시톨(mesitol), 3,5-디클로로-2-하이드록시벤젠설포산(DCHBS), 아닐린, p-톨루이딘, o-페닐렌 디아민, 메시딘(mesidine), 아스코르브산, 디하이드록시말레인산, 시토크롬 c, 아이오다이드, 요산, 페놀프탈레인, 2,2'-아지도-디(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰)산(ABTS), 그리고 SCN^- , Cl^- , Br^- 또는 I^- 와 같은 화합물로부터 선택되는 것이 바람직하다.

또 다른 구현예에 따르면, H_2O_2 -포획제는 식물 퍼옥시다제, 바람직하게는 블랙 래디쉬(black radish)로부터 추출된 것이다.

또 다른 구현예에 따르면, 상기 언급된 퍼옥시다제 조인자는 요산, 아스코르브산 또는 디하이드록시말레인산으로 구성되는 군으로부터 선택된다.

또 다른 구현예에 따르면, SOD와 H_2O_2 -포획제와의 복합체, 특히 퍼옥시다제와의 복합체는 선택적으로 퍼옥시다제 조인자를 가질 수 있으며, 특히 조 추출물 형태 또는 정제 형태로서 SOD 복합체의 10~50중량%의 농도로, 적어도 하나의 당, 특히 단당류 또는 이당류 및/또는 적어도 하나의 폴리올, 특히 50~1000g/mole의 분자량을 갖는 폴리올에 의해 더욱 안정화된다.

또 다른 구현예에 따르면, 이 복합체 생성물은 항산화제, 유용하게는 친유성 항산화제, 바람직하게는 토코페롤류 및 그의 유도체, 특히 아세테이트, 리놀레이트 또는 포스페이트와 같은 에스테르류의 항산화제를 유효 항산화제로 더욱 포함한다.

본 발명의 다른 특징은 또한 함께 기술된 특허 청구범위와 명세서로부터 분명하게 나타날 것이다.

2007년 8월 8일 2:49PM No. 0519 1. 3711

두 번째 태양에 따르면, 본 발명은 또한 조성물, 그 중에서도 특히 항-유리 라디칼 활성을 갖는 조성물, 예를 들어 화장품, 약품 또는 식품 조성물의 활성 주성분 또는 활성 성분의 하나로서 상술한 바와 같은 SOD계-복합체의 용도에 관한 것이다.

세 번째 태양에 따르면, 본 발명은 또한 조성물, 특히 항-유리 라디칼 활성을 갖는 조성물, 예를 들면 화장품, 약품 또는 식품 조성물에 관한 것으로, 이 조성물은 H_2O_2 -포획제, 유용하게는 퍼옥시다제, 바람직하게는 식품 퍼옥시다제, 더욱 바람직하게는 퍼옥시다제 특이적 환원기질로서 알려진 퍼옥시다제 조인자에 의해 안정화된 슈퍼옥사이드 디스뮤타제계- 또는 SOD계-복합체 생성물을 활성 성분 중 하나로서 포함하는 것을 특징으로 한다.

유용한 구현예에 따르면, SOD의 양은 총 조성물 중량의 0.01~10 중량%이다.

이 세 번째 태양에서, 혼합비는 변할 수 있으며, 원하는 용도에 따라 상이하다. 일반적으로, SOD의 혼합비는 0.01~30 중량%, 바람직하게는 0.1~10 중량%, 더욱 바람직하게는 1~5 중량%일 것이다.

퍼옥시다제는, 명세서 서론에서 기술한 것처럼, 퍼옥시다제 조인자로 알려진 특이적 환원 기질의 존재하에서 슈퍼옥사이드 음이온이 SOD에 의해 촉매화되어 과산화수소를 생성하는 디스뮤타데이션 반응등에 생성되는 과산화수소(H_2O_2)의 파괴를 촉매한다.

퍼옥시다제는 수많은 종류가 있고 당업자에게 잘 알려져 있다. 그들은 현재 척추(글루탐-퍼옥시다제), 우유(락토퍼옥시다제), 소 또는 선택적으로 인간의 적혈구(글루타티온 퍼옥시다제)로부터 추출되거나 보다 바람직하게는 본 발명에 따라 블랙 래디쉬(양고추냉이 퍼옥시다제)로부터 추출된다.

또한, 퍼옥시다제의 특이적 환원 기질은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 글루타티온, 페놀, 구아이아콜, 피로갈롤, 에시콜, 3,5-디클로로-2-하이드록시벤젠설포산(DCHBS), 아닐린, p-클루이딘, o-페닐렌 디아민, 에시딘, 아스코르브산, 디하이드록시말레인 산, 시토크롬 C, 아이오다이드, 요산, 페놀프탈레인, 2,2'-아지도-디(3-에틸벤조티아졸린-6-술폰)산(ABTS), 그리고 SCN^- , Cl^- , Br^- 또는 I^- 와 같은 화합물로부터 선택되는 것이 바람직하다.

본 발명의 범위내에서, 그 중에서도 특히 화장품, 약품 또는 식품 내에 사용하기 위해서는 SOD와 식품 퍼옥시다제와의 복합체, 특히 블랙 래디쉬로부터 추출된 식품 퍼옥시다제와의 복합체가 바람직하며, 유용하게는 조인자, 더욱 바람직하게는 요산, 아스코르브산 또는 디하이드록시말레인산을 포함하는 복합체를 제조하는 것이 바람직하다.

SOD에 첨가된 퍼옥시다제의 양은 SOD에 의해 유리되는 과산화수소의 양과 함수 관계에 있으므로, 그의 효소 활성과 함수관계에 있다. SOD 용액에 첨가되는 퍼옥시다제의 유니트 수는 약 0.01~1 퍼옥시다제 유니트/SOD 유니트이며, 바람직하게는 0.01~0.5 퍼옥시다제 유니트/SOD 유니트이다.

상술한 바와 같은 퍼옥시다제의 효소 조인자, 바람직하게는 요산은 0.001~1M의 농도로 효소 복합체에 첨가된다.

본 발명의 바람직한 변형 실시예에서, SOD 또는 SOD/퍼옥시다제/퍼옥시다제 조인자 복합체는 조 추출물 형태 또는 정제 형태로 SOD 또는 최종 복합체의 10~50 중량%의 농도로 첨가된 적어도 하나의 당 및/또는 적어도 하나의 폴리올에 의해 보다 더 안정화 될 수 있다.

당으로서는, 특히 단당류 또는 이당류, 그 중에서도 트레할로스가 사용될 수 있고, 폴리올로서는, 50~1000g/mole의 평균분자량을 갖는 폴리올이 특히 사용될 수 있으며, 예를 들면 글리세롤, 소르비톨, 말티톨 및 만니톨을 사용할 수 있다. 당 또는 폴리올의 첨가는 특히 예측하지 못한 방법으로 SOD를 안정화시킨다.

게다가, 본 발명의 다른 바람직한 구현예에서는, 친유성 항-산화제가 유용하게 첨가되고, 이러한 친유성 항-산화제는 토크페놀류 및 에스테르(아세테이트, 리놀레이트 또는 포스페이트 등)와 같은 토크페놀류 유도체 중 하나가 바람직하며, 이는 그러한 항-산화제가 SOD에 보다 높은 안정성을 준다는 특히 예기치 못한 방법이 발견되었기 때문이다. 토크페놀 포스페이트들은, 예를 들면 LVMH Recherche의 미국 특허 제 5,387,570 호에 기술되어 있다. SOD 효소의 안정성이 산화 문제와 관련되어 있지 않기 때문에, 또한 이 작용 메커니즘이 지금까지 알려지지 않았다는 사실로부터, 이러한 결과는 특히 예기치 못한 결과인 것이다. 이러한 항-산화제가 유용하게 친유성일 경우, 오일상으로, 즉 일반적으로 에멀전 형태로 조성물에 첨가될 것이다. 항산화제의 농도는 일반적으로 최종 조성물의 총 중량에 대해 0.01~3 중량%, 바람직하게는 0.1~1 중량%일 것이다.

네 번째 태양에 따르면, 본 발명은 또한 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 또는 SOD 추출방법에 관한 것으로, 발아단계를 겪은 식물 증자를 원료로서 사용하며, 이 발아단계는 실온에서 하루 이상을 수성의 습한 대기 또는 배지에 식물 증자를 정착시킴으로써 발아하는 동안에 최고 활성의 SOD를 얻고 SOD 활성이 최고일 때 SOD 활성을 추출하도록 조절되는 것을 특징으로 하며, 그 발아된 증자를 갖고, 4~50°C, 바람직하게는 실온에서 SOD가 추출되기에 충분한 시간 동안, 일반적으로 수상분에서 한시간 이상 동안 수용액으로 추출하고, 여과하고 SOD를 포함하는 여과액을 회수하는 단계를 포함하는 SOD 추출단계를 수행하는 것을 특징으로 한다.

유용한 구현예에서는, 이 발아단계는 실온에서 몇일 동안 현탁액상의 식물 증자를 수용액에 방치하는 단계를 포함한다.

바람직한 구현예에서는, 이 발아 단계가 발아 촉진제, 바람직하게는 지베렐린류에 속하는 화합물로 구성된 발아 촉진제의 존재하에서 이루어진다.

이 방법의 유용한 변형 실시예에서는, 이 발아단계 이전에, 하루 이상, 예를 들면 2일 동안 실온에서 또는 차갑게 수용액내에서 침적시키는 단계가 선행된다.

본 발명의 방법의 또 다른 변형 실시예에서는, 발아된 종자로부터 SOD를 추출하는 단계가 발아된 종자를 갈고, SOD 추출에 영향을 주기에 충분한 시간동안, 일반적으로 수십분~한시간 또는 서너 시간 동안, 실온에서 pH 약 8의 완충 수용액으로 추출하고, 여과하고 SOD를 포함하는 여과액을 회수하는 단계를 포함한다.

추출방법의 유용한 구현예에서는, 그 여과액을 침전제로 처리하여 프로테아제와 리폭시제나제를 포함한 불필요한 단백질을 제거하고, 비침전된 분획 또는 SOD를 포함하는 상층액을 구성하는 분획을 회수하여 SOD를 더욱 완전히 정제한다.

다른 더욱 유용한 변형 실시예에서는, SOD를 포함하는 비침전된 분획의 투석은 바람직하게는 6,000~8,000 달톤의 차단 역치(cut-off threshold)를 갖는 막을 사용하여, 물 또는 수용액에 대한 투석에 의해 이루어질 수 있다.

또 다른 특별히 바람직한 변형에서, 투석된 용액의 추가 정제는 또한 크로마토그래피 컬럼으로 수행될 수 있으며, 이 크로마토그래피는, 적당한 용출용액을 사용하여 세파덱스 QAE 컬럼으로 구성되는 것이 본 발명에 바람직할 것이다.

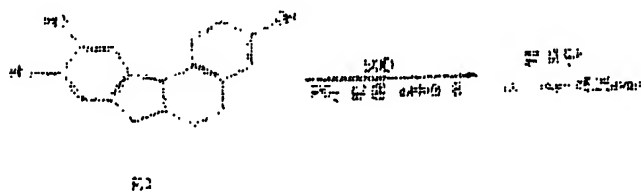
본 발명의 방법의 다른 유용한 구현예에서, 얻어진 SOD의 안정화는 상기 언급된 추출 단계 후, 즉 더욱 완전한 정제 단계 전 또는 정제단계 후에 퍼옥시다제, 바람직하게는 퍼옥시다제 조인자(또한 퍼옥시다제 특이적 환원 기질로서 알러진)와 같은 H_2O_2 -포획제를 첨가하여 직접적으로 얻어질 수 있다. 바람직하게는, 퍼옥시다제 유닛/SOD 유닛의 비로 표시된 SOD에 첨가된 퍼옥시다제의 양은 10~400인 반면에 퍼옥시다제의 효소 조인자는 0.001~1M의 농도로 존재하는 것이 본 발명에 바람직하다.

본 발명의 방법의 다른 유용한 구현예에서는, SOD의 안정화는 추출단계 후 또는 정제단계 후에 적어도 하나의 당, 특히 단당류 또는 이당류 및/또는 적어도 하나의 폴리올, 특히 50~1000g/mole의 평균분자량을 갖는 폴리올을 첨가함으로써 또한 이루어질 수 있다. 바람직하게는, 당 또는 폴리올은 정제된 추출물 또는 조 추출물 형태로서 SOD 또는 최종 SOD 복합체의 10~50 중량%의 농도로 첨가된다.

정제하거나 정제하지 않고 추출한 후, SOD를 포함하는 추출물은 선행기술(Nebot C. et al., published in Analytical Biochemistry, 1993, 214, pges 442-451)에서 당업자에게 공지된 방법으로 결정되어 얻어진다.

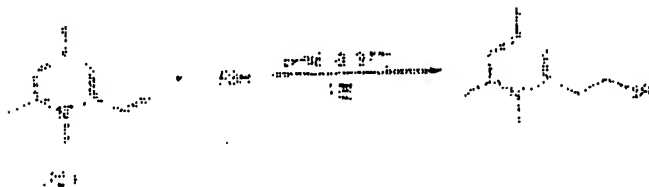
네보트(Nebot)의 방법은 SOD 활성을 갖는 촉매가 어느 것이라도, 다음 반응식 2에 따라, 알칼리 pH에서 가시광선을 흡수하는 발색단에 대하여 반응체 R1의 자동 산화를 가속화할 수 있다는 성질을 기초로 한다.

반응식 2



SOD-525 방법은 또한 두 번째 반응체 R2를 공격하여, 반응식 3에 따라서, 급속 알킬화 반응에 의해, 본 실험 샘플, 예를 들면 글루타티온에 존재할 수 있는 메르캅탄으로 인한 주요 간섭(interferences)을 제거한다.

반응식 3



SOD 활성의 측정은 pH 8.8에서 수행하므로써, 금지의 천연 SOD, 예를 들면 구리-아연 SOD, 망간 또는 철 SOD들을 불활성화시키지 않고 최적의 민감도로 측정할 수 있게 한다.

이러한 SOD-525 방법에 의하여 SOD 활성을 분광학적으로 측정할 수 있는 측정 키트로서 옥시스 인터내셔널 에스.에이.(Oxis International S.A.; 94385 Bonneuil sur Marne, France)에서 시판되는 측정 키트가 있다. 이 키트는 두 개의 반응체(R1과 R2)와 완충용액(완충액 3) 각각을 포함한다.

R1: 3.2×10^{-2} M HCl 내 상기 언급된 식의 색원체 R1의 용액

R2: 25%(w/v) 에틸렌 글리콜을 포함하는 DMSO 내 메르캅탄 포획체 R2의 용액

완충액 3: 0.11mM 디에틸렌 트리아민 펜타아세트산(DTPA)를 포함하는 pH=8.8(37℃)의 완충액

SOD-525 키트리는 이들로 상품화된 이러한 옥시스 인터내셔널 키트를 사용하여, 525nm의 파장에서 1cm의 광경로의 유리 셀 내에서 분광학적 측정을 수행한다. 흡광도(absorbance) 방출의 등력학 측정은 37℃에서 1분 동안 수행된다.

각각의 측정에서, 반응 속도는 얻어진 곡선의 최고 기울기 값을 구하여 결정된다. 이 기울기는 R1의 자동-산화 현상에 해당한다. 이 결과들을 단위 분당 흡광도 단위로 표현한다.

효소 활성의 계산은 다음과 같이 이루어진다:

V_0 와 V_{∞} 는 각각 대조군과 샘플에 대한 반응 속도이다. 분석할 샘플의 SOD 활성은 다음 식(1)에 따라 유도되며, 실험비 V_0/V_{∞} 와 SOD 활성 사이의 상관관계를 계산하여 결정한다.

$$\frac{V_0}{V_{\infty}} = 1 + \frac{[SOD]}{a[SOD] + b}$$

$a=0.073$ 이고, $b=0.93$ 이다.

옥시스에 의해 정의된 SOD-525의 1 유닛은 상기 조건하에서 V_0/V_{∞} 비가 2인 것에 해당한다.

얻어진 값을 측정방법에서 샘플의 회석율(25 팩터)을 곱한다. 이 결과들을 샘플 ml 당 SOD-525 유닛으로 표현한다.

본 발명의 관점에서는, SOD 활성과 정확히 상응하도록 V_0/V_{∞} 비 값을 유지시키기 위하여 얻어진 SOD 용액을 회석시킨 후 SOD의 효소 활성을 측정한다.

본 발명의 관점에서는, 얻어진 SOD 용액은 일반적으로, 1~2의 V_0/V_{∞} 비율 얻기 위하여, 추출방법으로부터 유래된 정제도의 함수로서, 300 팩터(factor) 이하로 회석된다.

SOD 용액의 활성은 측정과정의 샘플의 회석율(팩터 25)과 SOD 용액 자체의 회석율(예를 들면 300 팩터 이하)을 고려하여 측정된다.

측정법의 예들은 실시예와 관련하여 주어질 것이다.

본 발명은 특히 항-유리 라디칼 활성을 갖는 조성물, 예를 들면 화장품, 약품 또는 식품 조성물을 더욱 망라하며, 이들 조성물은 활성 성분의 하나로서 발아단계를 거친 식물 종자로부터 얻어진 식물 SOD를 포함하는 것을 특징으로 한다.

본 발명의 다른 목적, 특징 및 장점은 단순히 예시의 방법으로 주어진 본 발명의 몇 가지 실시예를 참고로 하여 만들어진 다음의 설명에서 더욱 명백해질 것이며, 이 실시예는 본 발명의 범위를 제한하는 것이 아니다. 이들 실시예에서, 모든 양은 다른 언급이 없는 한 중량으로 주어진다. 또한, 다른 특별한 언급이 없으면, 첫 번째 온도는 섭씨이고 실온이며, 압력은 대기압이다.

실시예는 본 발명의 필수 부분이고, 어떤 선행기술에 대해서도 신규한 실시예의 특징은 모두 그렇게 청구된 본 발명의 일반적 특징을 구성한다.

실시예 1

발아된 보리로부터 SOD 추출

SOD의 추출은 다음 방법을 따른다.

a) 보리의 발아

상업적으로 이용가능한 보리, 예를 들면 볼 보리 종종(Dallas)을 사용하고, 수용액, 예를 들면 수돗물 또는 바람직하게는 광물질이 제거된 물에 차갑게, 예를 들면 15℃에서 하루 또는 그 이상, 예를 들면 이틀간 적신다.

종자를 평준시켜 발아를 준비할 목적으로 적신 후, 발아단계라고 적절히 불리는 단계들 몇 일간, 예를 들어 5일간, 바람직하게는 지베렐린산과 같은 발아촉진제의 존재하에서 0.1ml/kg(건조원료 납량의 중량)의 농도로 수행한다.

b) 추출 방법

맥아로써 또한 알려진 발아된 보리로부터 추출하는 방법은 다음과 같다:

보리 종자의 발아 후, 맥아를 갈고, pH 8 정도의 완충 수용액(바람직하게는 50mM 트리스 HCl+1mM EDTA로 구성됨)으로 약 1시간 동안 실온에서 추출한다.

추출액을 여과시켜 걸질을 제거하고, 20분 동안 4000G로 원심분리하여 다당류 부분을 제거하고, 여과액 또는 상층액을 회수하고 상업용 키트(옥시스 인터내셔널 제, 94385 Bonneuil sur Marne, France; 1993)를 사용하여 네보트 등의 상기 언급된 방법으로 SOD 활성을 측정한다. SOD-525/g(건조 원료 물질의 중량) 활성이 얻어진다.

SOD 활성은 14ml의 물로 1ml의 SOD 추출액을 회석한 후 측정한다. 회석된 용액 40μl를 측정한다. 측정된 V_0/V_{∞} 비는 1.95이다. 상기 언급된 16쪽의 식(1)로부터, SOD 활성은 0.95 SOD-525 유닛이다. 그러므로 이 SOD 활성은 $0.95 \times 25 \times 15 = 356.25$ SOD-525 유닛/ml와 같으며, 이 실시예에서는 1482 SOD-525 유닛/g(건조 원료 물질의 중량)이다.

c) 추가 정제:

상기 원심분리로부터 얻어진 여과액 또는 상층액은 프로테아제 또는 리췌시제나제와 같은 원하지 않는 단백질을 제거하는 침전제, 예를 들면 암모늄 설페이트를 390g/l의 농도로 사용하여 침전시킨다.

4000G로 20분간 20°C에서 원심분리하여 침전물을 제거하고 SOD를 포함하는 상층액으로 구성된 액체 분획을 회수한다.

상층액은 6000 달톤보다 작은 분자량을 갖는 고농도의 작은 분자 및 염을 제거하기 위하여 유용하게 투석될 수 있다. 이 투석은 6,000~8,000 달톤, 예를 들면 6,000 달톤의 차단 역치를 갖는 막을 사용하여 광물질이 제거된 물에 대하여 수행된다. 실제로, SOD는 30,000 정도의 분자량을 갖는 것으로 그러한 막 공을 통과하지 못하므로, 효소 특이적 활성을 증가시키게 된다.

상기 방법에 따른 투석물상에 측정된 SOD 활성은 7,500 SOD-525 유닛/g(건조 원료 물질의 중량)이다.

d) 선택적 추가 컬럼 정제:

상기 단계 c)에서 얻어진 투석물로부터, 크로마토그래피 컬럼상에서 정제함으로써 더욱 완전한 정제를 수행하는 것도 가능하다.

크로마토그래피는 예를 들면, 세파덱스 QAE 컬럼(Sephadex QAE column)으로 수행될 수 있으며, 이는 SOD를 정제하고 그 추출물의 단백질 오염물을 제거할 수 있도록 한다.

실시예 2

대두 종자로부터 SOD 추출

실시예 1에 기술된 방법을 수행한다.

단계 b 후에 180IU₅₀₀/g(건조 원료 물질의 중량)의 SOD 활성이 얻어진다.

실시예 3

발아된 밀 낱알로부터 SOD 추출

실시예 1에 기술된 것과 같은 방법을 사용하고 단계 b의 추출 생산물에 대해 SOD 활성을 측정하여 116IU₅₀₀/g(건조원료물질의 중량)의 SOD 활성을 얻는다.

실시예 4

발아된 완두콩으로부터 SOD 추출

상업적으로 이용가능한 하얀 완두콩(Pisum sativum)을 사용한다. 실시예 1에 기술된 것과 같은 방법을 사용하고 단계 b에서 얻어진 생산물에 대해 SOD 활성을 측정한다. 80IU₅₀₀/g(건조원료물질의 중량)의 SOD 활성을 얻는다.

실시예 5

발아 시간을 달리하거나, 지베렐린류에 속하는 분자와 같은 발아 활성제의 존재 또는 비존재하에서 다른 보리 품종을 사용하여 SOD 활성 변화를 측정

실시예 5-a

발아시간을 달린한 SOD 활성 변화 측정

발아시간을 달리하여 발아된 달라스 품종 보리로부터 SOD 활성을 측정하고, 다른 일반적인 조건은 실시예 1-a의 발아 방법을 사용한다.

하기 표 1에 나타난 결과를 얻는다.

[표 1]

SOD 활성 IU ₅₀₀ /g(건조원료중량)	발아시간(일)
50	1
120	2
290	3
410	4
480	5

표 1의 결과로부터, SOD 활성은 1일 발아 후 두배 이상이 되었으며 그 활성은 3일 발아 후 다시 두배 이상이 되었고 그 활성은 다시 4일 및 5일 발아 후 상당히 증가한다는 것을 알게되었다.

실시예 5-b

SOD 활성에 대한 보리 품종의 영향 측정

SOD 활성에 대한 보리 품종의 영향을 측정하였고 얻어진 결과는 다음 표 2에 나타난다. 이 비교는 5일

간의 일정한 발아 시간으로 측정하였으나 발아 촉진제 없이, 다른 발아조건은 실시예 1-a와 동일하였다.

[표 2]

보리 품종	SOD 활성 $IU_{SOD}/g(\text{건조 원료 중량})$
나타샤(Natasha)	239
펠리시(Felicie)	271
달라스(Dallas)	214
매직(Magic)	218
푼핀(Puffin)	247

표 2로부터, 얻어진 SOD 활성의 결과는 다양한 품종에 대해 약간의 변화가 존재하지만 이들 결과는 완전히 일치한다는 것을 알 수 있으며, 이는 본 발명이 재현성이 있음을 증명하는 것이다.

실시예 5-c

지베렐린류 분자 존재의 영향

지베렐린 산과 같은 발아 촉진제 존재의 영향을 또한 측정하였고 그 결과는 표 3에 나타내었다. 이들 실험은 실시예 1의 방법에 따라 5일의 발아 기간 동안 봄 보리(나타샤 품종)를 가지고 수행하였다.

[표 3]

지베렐린 산	SOD 활성 $IU_{SOD}/g(\text{건조물질중량})$
없음	239
0.1mg/kg(농양 중량)	407

표 3으로부터 발아 촉진제의 존재는 제조된 SOD의 양을 특히 예기치 않은 방법으로 증가시킨다는 것을 알 수 있다.

실시예 6

폴리올에 의한 SOD의 안정화

실시예 1의 단계 b)에서 얻어진 조 추출물 형태의 SOD는 20℃에서 46일 후에 그것의 효소 활성의 60%를 유지한다.

만약 이 조 추출물에 이 추출물의 최종 용액에 대해 소르비톨을 20 중량% 첨가하면(즉 단계-1b의 SOD 추출물+최종 용액의 소르비톨 20 중량%), SOD 효소의 안정성은 갑작스럽게 증가하고 초기 활성의 76%가 20℃에서 46일 후에 회복된다.

실시예 7

당에 의한 SOD의 안정화

SOD의 효소 활성은 당, 바람직하게는 단당류 또는 이당류의 첨가로 안정화 될 수 있다는 것이 발견되었다. 이 실시예에서는 트레할로스_{tm}가 사용된다.

만약 최종 용액의 중량에 대하여 트레할로스 30 중량%를 실시예 1 단계 b)에서 얻어진 조 SOD 추출물에 첨가하는 것 외에는 실시예 6에서 기술된 것과 동일하게 진행한다면, 초기 활성의 75%가 20℃에서 46일 후에 회복되어 안정성이 놀랄만큼 증가한다는 것을 알 수 있다.

실시예 8

퍼옥시다제 및 조인자에 의한 SOD의 안정화

단계 1-d 또는 실시예 1의 이전 단계에서 얻어진 SOD의 농축용액은 형성된 과산화수소를 파괴할 수 있는 다른 효소와 복합체를 형성하거나 결합된다.

이런 목적으로 사용할 수 있는 효소는 H_2O_2 를 H_2O 및 O_2 로 전환시키는 카탈라제일 수 있으나 카탈라제가 화장품에서 풍목해가되지 않은 생산물 목록에 속하는 경우에는 카탈라제를 사용하지 않는다. H_2O_2 의 파괴를 촉매하는 퍼옥시다제가 또한 사용될 수 있지만 특이적 환원기질 또는 조인자가 필요하다. 퍼옥시다제 및 조인자의 목록은 본 명세서의 서론에 기재하였다.

본 실시예에서는, 불행 라디칼로부터 추출된 식물 퍼옥시다제(또는 양고추냉이 퍼옥시다제; 이후 HRP로 약함)가 요산으로 구성된 효소 조인자와 결합하여 퍼옥시다제로 사용된다.

본 실시예 내용 중에는, SOD에 첨가되는 퍼옥시다제의 양은 SOD 400 유니트에 대해 퍼옥시다제 약 10 유니트이며, 이 SOD 유니트는 상술된 방법에 따라 측정되며, 퍼옥시다제 유니트는 베르그메이어(Bergmeyer H.U.)에 의해 기술된 방법(Method of Enzymatic Analysis(1974), vol. 1, 2nd ed., page 494)에 의해 측

정된다.

여기서 요산으로 구성된 퍼옥시다제의 효소 조인자가 SOD/퍼옥시다제 효소 복합체에 0.01~1M, 바람직하게는 0.5M의 농도로 첨가된다.

바람직하게는 형성된 복합체는 본 실시예에서 선택된 농도 즉, 최종 용액의 30 중량%의 농도로 첨가된 당 또는 폴리올에 의해 더욱 안정화된다.

SOD/퍼옥시다제/조인자 복합체는 항-라디칼 활성 또는 유리 라디칼 포획활성을 갖는 조성물, 즉 화장품, 약품 또는 식품 조성물 또는 그와 같은 것들의 처방에 사용될 수 있다. 이 복합체는 또한 안정성, 항-라디칼성 및 독성 시험의 대상이 되며, 이들은 각각 다음 실시예 9, 10 및 11에 기재한다.

실시예 9

안정성 시험

실시예 8에서 형성된 복합체의 효소 활성의 안정성은 20℃ 및 45℃에서 각각 수행하였고 얻어진 결과는 하기 표 4에 주어진다.

[표 4]

일수	SOD 활성 SOD-525 유닛/ml	SOD 활성 SOD-525 유닛/ml
	20℃	45℃
0	5025	5025
7	4800	4275
11	7575	3575
13	5925	3150
18	4500	2800
20	2475	2400
35	3975	2475

표 4로부터, 35일 동안 효소활성의 80%가 유지되었으므로 효소 활성은 20℃에서 1개월 동안 안정한 반면에, 45℃에서는 50% 정도의 효소활성의 저하가 나타난 것을 알 수 있으므로, 이는 이 온도에서 효소 활성의 저하가 매우 작다는 것을 나타낸다.

그러므로 관찰된 것은 식물 SOD/퍼옥시다제/조인자 복합체는 뛰어난 안정성, 특히 45℃에서 뛰어난 안정성을 지니며, 이는 당업자가 예측할 수 있는 것이 아니다.

실시예 10

항-라디칼 활성 또는 유리 라디칼 포획 활성의 측정

1) 라디칼 포획의 인비트로(in vitro)의 평가 방법 3가지가 사용되었다.

a) 첫 번째 방법은 크산틴 옥시다제로 구성된 효소계를 사용하며, 크산틴 옥시다제는 그의 기질인 크산틴을 산화시키는데 있어서, 슈퍼옥사이드 라디칼을 생산한다. 후자는 시토크롬 C(Fe^{+3})를 시토크롬 C(Fe^{+2})로 환원시킬 수 있고, 반응의 동역학은 550nm의 UV-가시 분광광도계로 측정될 수 있다. 그들은 또한 포획에 대하여 시토크롬 C와 경쟁할 수 있고 슈퍼옥사이드 라디칼을 제거할 수 있는 SOD의 라디칼의 기질이다. SOD 활성을 포함하는 제제를 첨가하면 이들 환원 동역학은 느려진다. SOD 활성의 계산은 시험 중인 SOD에 의해 시토크롬 C의 환원이 저해되는 퍼센트를 계산하여 이루어진다.

인터내셔널 시스템으로 표현된 1SOD 유닛(1 IU_{SOD})는 pH 7.8, 온도 25℃에서 시토크롬 C의 환원이 50% 정도 감소하는데 필요한 활성에 해당한다.

시험되는 샘플은 시토크롬 C의 환원을 50% 저해하기 위한 조건을 결정하기 위하여 희석되며, 이는 1 인터내셔널 시스템 유닛에 해당한다.

시험되는 샘플의 총 SOD 활성은 샘플의 총 부피까지 측정된 샘플의 부피와 샘플의 초기 희석율을 고려하여 측정된다.

이 방법으로 측정된 실시예 8에 형성된 복합체의 SOD 활성은 4455 IU_{SOD} 유닛/ml이다.

b) 두 번째 방법은 옥시산 인터내셔널사제의 상용되는 측정키트(상품명 SOD-535 kit)로 구성되며, 이 키트는 SOD 활성을 갖는 촉매는 어느 것이라도 테트라시클릭 카테콜 유도체(5,6,6a,11b-테트라하이드로-3,9,10-트리하이콕시벤조플루오렌)의 자동-산화로 가속화시킬 수 있다는 성질을 기초로 하고 있다.

이 측정방법은 카테콜 유도체의 산화도 2를 공한 디스뮤타제의 양으로 정의된 SOD-525 유닛 환산의 SOD 활성을 측정할 수 있도록 한다.

이러한 방법으로 측정된 실시예 8에서 형성된 복합체의 SOD 활성은 4375 SOD-525 유닛/ml이다.

그러므로 이들 두 가지 방법으로 얻어진 SOD 활성 값은 본질적으로 동일하다는 것을 알 수 있다.

c) 사용된 세 번째 방법은 전자 회전 공명법(ESR로 약칭)이다.

ESR은 분자의 단일 전자의 회전 상태의 특성, 특히 유리 라디칼의 특성을 고려한 기술이다. ESR에 의한 실시예 8에서 얻어진 SOD/퍼옥시다제/조인자 복합체의 항-라디칼 활성의 평가는 슈퍼옥사이드 및 하이드록시 라디칼 포획활성을 구별할 수 있게된다[Rosen G. M. and Rauckman E.J. in Methods in Enzymology(1984), 105, pages 198-209].

유리 라디칼의 매우 짧은 수명($OH\cdot$ 기의 경우 약 10^{-11} 초) 때문에 하이드록시 라디칼 활성의 검출능력이 제한된다. 이런 이유로, $O_2\cdot^-$ 와 $OH\cdot$ 라디칼은 스핀트랩(spin-trap)을 사용하여 관찰된다. 이 분자는 유리 라디칼 존재하에서 공명하고 그들을 ESR로 검출가능한 특징적 스펙트럼을 갖는 복합체 형태로 안정화시킨다.

스핀-트랩 분자에 의해 방출된 신호 크기의 감소는 이 시험 생산물의 포획 효과의 직접적인 증거이다.

ESR 측정은 실온에서 브뤼커 ESP 106 분광계로 수행하고; 사용된 스핀-트랩은 5,5-디메틸-1-피롤린-1-옥사이드(DMPO)이다.

슈퍼옥사이드 음이온은 DMPO(80mM)과 50%(v/v) 에탄올의 존재하에서 크산틴(1.5mM)/크산틴 옥시다제(12mU/ml) 효소계에 의해 제조된다. 실시예 8에서 얻어진 SOD/퍼옥시다제/조인자 복합체를 여러 가지 농도로 초고순도 물에 해리시킨다.

하이드록시 라디칼은 DMPO(160mM)의 존재하에서, 0.2%(v/v) 과산화수소 수용액의 광분해(UVB)에 의해 제조된다. 실시예 8에서 얻어진 SOD/퍼옥시다제/조인자 복합체를 여러 가지 농도로 초고순도 물에 해리시킨다.

ESR 신호 크기는 최저 영역 스펙트럼 선을 중적분하여 계산된다. 시험중인 생산물의 보호 퍼센트는 시험 생산물 없는 블랭크 값으로부터 얻어진다.

$$\% \text{보호} = \frac{|S_{\text{생산물}} - S_{\text{블랭크}}|}{S_0 - S_{\text{블랭크}}} \times 100$$

$S_{\text{생산물}}$: 시험 화합물 또는 블랭크로 얻어진 ESR 신호의 적분

$S_{\text{블랭크}}$: 블랭크로 얻어진 ESR 신호의 적분

S_0 : 유리 라디칼이 없을 때 얻어진 ESR 신호의 적분

슈퍼옥사이드 라디칼의 효과

실시예 8에서 얻어진 SOD/퍼옥시다제/조인자는 약물-의존 방식으로 슈퍼옥사이드 음이온의 ESR 신호를 감소시킨다. 5 및 10%(v/v)에서 그 복합체는 ESR 신호를 44% 및 54% 저해한다.

하이드록시 라디칼의 효과

실시예 8에서 얻어진 SOD/퍼옥시다제/조인자 복합체는 약물-의존 방식으로 하이드록시 라디칼의 ESR 신호를 감소시킨다. 0.3%(v/v) 농도에서, 그것은 ESR 신호를 93% 저해하기 때문에 그 효과는 놀랍다.

실시예 8에서 얻어진 SOD/퍼옥시다제/조인자 복합체는 화장 조성물에 일반적으로 적용되는 낮은 농도에 서조차 하이드록시 라디칼 및 슈퍼옥사이드 음이온에 대해 매우 놀라운 항-라디칼 효과를 갖는다.

2) 항-라디칼 활성의 엑스비보(ex vivo) 평가 방법이 정상 인간 섬유아세포 배양에 사용되었다.

UVA로 조사한 후, 인간 섬유아세포의 배양액에서 형성된 유리 라디칼은 적당한 방법으로 정량된다. 항-라디칼제의 사용은 산화력을 감소시키고, 다른 농도에서 실시예 8에 따른 식물 SOD/퍼옥시다제/조인자 복합체의 효율을 계산한다.

정상 인간 섬유아세포는 실시예 8의 식물 SOD/퍼옥시다제/조인자의 존재하에서 1 시간 동안 배양되고, 광물질이 제거된 물에서 0.01, 1 및 10%(v/v)로 시험된다. 이 세포를 발광의 UVA선(10 J/cm^2)으로 유발시킨 라디칼력에 노출시킨다. 형성된 유리 라디칼(하이드로퍼옥사이드)을 하이드록시퍼옥사이드의 존재하에서 정량가능한 형광성 유도체로 스스로 변하는 적당한 탐침으로 검출한다.

결과는 우선 배양용기 당 미규정된 단위의 형광성으로 표현된다. 효율은 다음 식(3)을 이용하여 계산된다.

$$E(\%) = \{ (F - IF) / (IF - ITF) \} \times (-100)$$

여기서

E: 효율 퍼센트

NIF: 조사되지 않은 섬유아세포로 관찰된 형광성

IF: 조사된 섬유아세포로 관찰된 형광성

ITF: 조사되고 처리된 섬유아세포로 관찰된 형광성

본 발명에 따라 형성된 식물 SOD/퍼옥시다제/조인자 복합체 1%를 포함하는 수용액은 UVA선에 의해 발생된 산화력과 연계된 유독효과를 80% 이상 감소시킬 수 있다.

이 효율은 매우 효과적이라고 알려져 있으나 큰 안정성 문제를 나타내는 대조 혼합물 글루타티온/비타민

C를 사용하여 얻은 것보다 크다.

따라서, 사용 중인 가장 높은 농도에서, 실시예 8에 따른 식물 SOD/퍼옥시다제/조인자 복합체는 UVA선에 의한 산화력 발생 후 배양된 인간 섬유아세포를 효과적으로 보호할 수 있게 한다.

3) 항-라디칼 활성의 인비보(in vivo) 평가 방법은 건강한 지원자들의 피부 조직을 사용하여 이루어졌다.

UVA 조사후 형성된 유리 라디칼은 피부 조직의 불포화 지방을 과산화수소화한다. 스트리핑으로 과산화수소된 물질을 갖는 각막세포를 제거한다. 반응 매체에서, 과산화물은 과산화물 존재 정도와 직접 비례하는 형광을 발하는 형광 탐침에 의해 가시화된다.

II 또는 III 포토타입, 즉 정상 코카서스 피부 타입의 20~38세 여성 지원자 일곱 명을 선택한다.

팔쪽 영역을 3가지로 규정하고 이들 영역중 2개를 UVA 선 3000S 램프를 사용하여 UVA(10 J/cm²)로 조사한다. 얻어진 일시적인 레드 마크는 조사 후 하루면 볼 수 없고 염증과정이 관찰되지 않는다.

본 발명에 따라 형성된 식물 SOD/퍼옥시다제/조인자 1%를 포함하는 수용액을 2시간 간격으로 4번 (2μl/cm²) 투여한다.

UVA로 조사한 후 24시간 후, 연속하여 두 번 스트리핑하여 각질층 샘플을 얻는다.

형성된 과산화물은 과산화과정에서 일반적인 반응을 나타내는 형광 탐침에 의해 2차 스트리핑 상에 가시화된다.

결과는 첫 번째로 미규정 단위의 형광성으로 표현된다. 효율은 다음 식(4)을 사용하여 계산된다.

$$E(\%) = [(TIZ - IZ) / (IZ - NIZ)] \times (-100)$$

여기서:

E(%): 효율 퍼센트

TIZ: 처리되고 조사된 영역 위에서 측정된 형광성

IZ: 조사된 영역 위에서 측정된 형광성

NIZ: 조사되지 않은 영역 위에서 측정된 형광성

본 발명에 따라 형성된 식물 SOD/퍼옥시다제/조인자 복합체 1%를 포함하는 수용액은 UVA 조사로 유도된 피부 라디칼 양력을 65% 효율로 보호할 수 있다.

실시예 11

독성

독성실험은 실시예 8에서 얻어진 본 발명에 따른 복합체를 사용하여, 토끼의 첫 번째 피부 자극의 평가(9a), 토끼의 눈 자극의 평가(9b), 랫트의 단회의 경구 투여에 의한 비정상적인 독성 부재(9c) 및 기니 피크의 민감성 연구에 의해 수행되었다.

11a-토끼의 첫 번째 피부 자극의 평가

실시예 8에서 얻어진 제조물을 회색하지 않고, "피부 위의 자극/급성 침식 효과" 연구에 관한 방법(OECD directive No. 404에 의해 추천된 방법)에 따라 3마리 토끼의 피부에 0.5ml의 약물을 투여하였다.

이 연구의 결과로부터 본 발명에 따라 실시예 8에서 얻어진 제조물은 회색되지 않은 상태에서조차 자극이 없는 것으로 간주될 수 있다고 결론지을 수 있다.

11b-토끼의 눈 자극의 평가

실시예 8에서 얻어진 동일 제조물 0.1ml을, "눈 위의 자극/급성 침식 효과" 연구에 관한 방법(1987년 2월 24일자 OECD directive No. 405에 의해 추천된 방법)으로 3마리 토끼의 눈에, 순수하게 단지 한번에 적하하였다.

이 시험 결과로부터 본 발명에 따라 실시예 8에서 얻어진 제조물은 순수하게 또는 회색하지 않고 사용될 때 눈에 자극이 없다고 간주할 수 있다고 결론지을 수 있다(the directive 91/326 EEC의 의미).

11-c 랫트에 1회 경구투여시 비정상적 독성의 부재에 관한 시험

본 발명에 따라 실시예 8에서 얻어진 제조물을 체중 kg당 5g의 용량으로, 1987년 2월 24일자 OECD directive No. 401에서 제안된 방법에 따라 5마리 수컷 랫트와 5마리 암컷 랫트에 1회 경구투여하였다.

이 시험 결과로부터, 실험적 조건하에서, 본 발명에 따라 실시예 8에서 얻어진 제조물은 어떤 비정상적 독성도 갖지 않는다고 결론지을 수 있다.

11d-기니 피크의 민감성에 관한 연구

실시예 8에서 얻어진 SOD 복합체 용액은 마그누손과 크리그만의 방법[the method of Magnusson and Kilgman published in J. Invest. Derm. (1969), 52, pages 268-276]에 따라 민감성의 연구에 대상이었다. 이 SOD 복합체 용액을 그 자체로 프레온드의 보조제(Freund's adjuvant)로 미리 처리한 35 마리의 기니 피크의 피부에 투여하고 2개의 실험군, 대조군 및 처리된 군으로 각각 나누었다.

두 개의 실험군에는 어떤 반응도 관찰되지 않았다.

얻어진 결과는 본 발명에 따라 형성된 식물 SOD/퍼옥시다제/조인자 복합체는 어떠한 민감성 반응의 현상도 일으키지 않는다는 것을 보여준다.

실시에 12

본 발명에 따른 식물 SOD/퍼옥시다제/조인자 제조물을 포함하는 화장품 에멀전 형태의 조성물의 제조
본 발명에 따른 실시예 8에서 얻어진 제조물을 크림 총 중량에 대해 5 중량%의 농도로 크림에 혼합한다.
이 크림은 다음 조성을 갖는다:

INCI 명칭:

A-스테아레트(steareth)-2	3%
스테아레트-21	2%
폴리프로필렌 글리콜-15 스테아릴 에테르	9%
카테아릴 알콜	2.5%
B-부틸렌 글리콜	4.5%
물	73.3%
C-파라벤(paraben) 및 페녹시에탄올을 포함하는 방부제	0.5%
D-토코페롤	0.2%

본 실시예 8의 본 발명에 따른

식물 SOD/퍼옥시다제/조인자 복합체 5%

이 크림의 효소 활성은 수성상과 유기상의 분리 후, 특정 조건으로 수행하여 측정한다: 2g의 크림을 8g의 0.2M 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 완충용액(pH 8.5)으로 5배 희석하고, 10%의 NaCl을 첨가한다. 이 혼합물을 5분 동안 격렬히 교반(Ultra-turax로 얻어지는 형태의 교반)하고 25분 동안 5000r./분으로 원심 분리한다. 이 효소 활성은 추출된 수성상에서 직접 측정한다.

상술된, 크림 형태로 혼합된 실시예 8에서 얻어진 제조물의 효소 활성의 안정성은 20℃와 45℃에서 40일간 시험되었다.

그 결과는 표 5와 같다.

[표 5]

일수	실시에 8에서 얻어진 본 발명에 따라 안정 화된 SOD 복합체의 SOD 활성 (%) 20℃	실시에 8에서 얻어진 본 발명에 따라 안정 화된 SOD 복합체의 SOD 활성 (%) 45℃	실시에 1 단계 b)에서 얻어진 추출물의 조 SOD의 SOD활성 (안정화되지 않음) (%) 45℃
0	100	100	100
1	100	100	0
3	89	83	0
6	69	83	0
18	92	64	0
25	70	66	0
40	60	50	0

20℃에서 40일 경과후 크림내에서 회복된 효소 활성은 안정화된 SOD 형태에 대해서는 60%이다. 더욱 높
라운 것은, 45℃에서 40일동안 저장된 크림내에서 회복된 효소 활성은 50%인 반면에 안정화되지 않은 형
태는 이 온도에서 저항하지 못했다.

크림에 혼합된, 본 발명에 따른 복합체의 안정성 시험은 그 복합체가 20℃에서 뛰어난 안정성, 특히 45
℃에서 예기치 못한 안정성을 갖는다는 것을 보여준다.

실시에 13

여러 가지 퍼옥시다제를 갖는 식물 SOD 복합체의 제조

실시에 13A

SOD 복합체/양고추냉이 퍼옥시다제

실시에 1의 단계 1c에서 얻어진 SOD 용액은 다수 유닛 단위의 양고추냉이 식물의 퍼옥시다제(HRP)를
SOD 유닛에 대한 HRP 유닛의 비가 10~400이 되도록 첨가하여 사용된다.

이렇게 얻어진 식물 SOD/양고추냉이 퍼옥시다제의 제조물은 그대로 또는 바람직하게는 효소 조인자, 예를 들면 요산, 아스코르브산 또는 디하이드록시말레인산과 결합시켜 사용될 수 있다.

실시에 13B

식물 SOD/아트로마이세스 라모수스(*Arthromyces ramosus*) 퍼옥시다제 복합체

참고문헌 시그마(Sigma P 4794)에 따라 상용되는 아트로마이세스 라모수스로부터 얻어진 퍼옥시다제를 사용하는 것을 제외하고는 실시예 13A와 같은 방법을 수행한다.

실시에 13C

식물 SOD/대두 퍼옥시다제 복합체

참고문헌 시그마(Sigma P1462)에 따라 상용되는 대두로부터 추출된 퍼옥시다제를 사용하는 것을 제외하고는 실시예 13A와 같은 방법을 수행한다.

실시에 14

당 또는 폴리올을 갖는 식물 SOD/퍼옥시다제/조인자 복합체의 안정화

실시에 8에서 얻어진 식물 SOD/퍼옥시다제/조인자 효소 복합체의 안정화는 다음 변형 실시예에 따라 하나 이상의 당 또는 폴리올을 첨가함으로써 증가된다:

실시에 14A

글리세롤의 첨가

본 발명에 따른 실시예 8에서 얻어진 제조물에 본 실시예에서 선택된 최종 용액의 총량에 대하여 30 중량%의 농도로 실온에서 교반하면서 글리세롤을 첨가한다.

실시에 14B

소르비톨의 첨가

소르비톨을 사용하는 것을 제외하고는 실시예 14A와 같이 수행한다.

실시에 14C

말티톨(maltitol)의 첨가

말티톨을 사용하는 것을 제외하고는 실시예 14A와 같이 수행한다.

실시에 14D

만니톨의 첨가

만니톨을 사용하는 것을 제외하고는 실시예 14A와 같이 수행한다.

실시에 14E

트레할로스의 첨가

트레할로스를 사용하는 것을 제외하고는 실시예 14A와 같이 수행한다.

실시에 15

다른 퍼옥시다제 조인자를 갖는 효소 복합체의 형성

실시에 8에서 사용된 요산이외 다른 퍼옥시다제 조인자를 사용하는 것을 제외하고는 실시예 8에서 기술된 것과 같이 수행한다.

실시에 15A

아스코르브산

요산 대신에 아스코르브산을 0.01~1M, 바람직하게는 0.5M의 농도로 사용하는 것을 제외하고는 실시예 8에 기술된 것과 같이 수행한다.

실시에 15B

디하이드록시말레인산

요산 대신에 디하이드록시말레인산을 0.01~1M, 바람직하게는 0.5M의 농도로 사용하는 것을 제외하고는 실시예 8에서 기술된 것과 같이 수행한다.

실시에 16

피부의 노화방지, 주름방지 및 스트레스 방지용 항-라디칼 화장품 제조물에 특히 적당한 수중유 에멀전 형 화장 조성물

표시된 백분율 조성을 갖는 다음 다섯 가지 성분 A, B, C, D 및 E를 사용하여 통상의 방법으로 수중유 에멀전 형태의 조성물을 제조한다.

INCI 명칭:

A-다음중 포함하는 유상:

스테아레트-2	3%
스테아레트-21	2%
폴리프로필렌 글리콜-15 스테아릴 에테르	9%
세테아릴 알콜(Cetearyl alcohol)	2.5%
8-루티렌 글리콜	4.5%
물	73.3%
C-파라벤과 페녹시에탄올을 포함하는 방부제	0.5%
D-토코페롤	0.2%
E-실시에 8의 본 발명에 따른 식품 SOD/퍼옥시다제/조인자 복합체	5%

80℃에서 유상 및 수상을 각각 가열한 후, 수중유 유상액이 얻어질 때까지 상 B를 상A에 혼합하고 상C, 상D 그리고 나서 상E를 혼합한다.

실시예 17

항-염증 활성을 갖는 약제학적 조성물

본 조성물은, 통상의 약제학적 활성 성분뿐 아니라, 본 발명에 따른 실시예 8에서 얻어진 제조를 5 중량%을 약제학적으로 허용가능한 무형제와 함께 혼합하여 포함한다.

실시예 18

산화에 대해 안정화된 식품 조성물

본 식품 조성물은 산패에 대해 안정성을 가지며, 통상의 식품 활성 성분뿐 아니라, 본 발명에 따른 실시예 8에서 얻어진 제조를 5 중량%을 다른 활성 성분과 함께 혼합하여 포함한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

H₂O₂-포획제, 유용하게는 퍼옥시다제, 바람직하게는 식물 퍼옥시다제, 더욱 바람직하게는 퍼옥시다제 특이적 환원 기질로 알려진 퍼옥시다제 조인자에 의해 안정화된 슈퍼옥사이드 디스뮤타제계- 또는 SOD계-복합체 생성물

청구항 2

제1항에 있어서, SOD가 발아 후의 식물증자로부터 추출하여 얻어진 것을 특징으로 하는 복합체 생성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 식물 증자가 곡류 낱알 또는 콩과식물 증자 또는 유성식물 증자인 것을 특징으로 하는 복합체 생성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 곡물이 밀 또는 보리, 바람직하게는 보리, 콩 또는 겨우 콩종을 포함하고; 그 콩과식물 증자가 렌즈콩 또는 완두콩을 포함하고; 그리고 유성식물 증자가 대두 증자를 포함하는 것을 특징으로 하는 복합체 생성물.

청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 언급된 발아가 수성의 습한 배지 또는 대기 내에서, 바람직하게는 발아 촉진제의 존재하에서, 4~50℃의 온도로, 유용하게는 실온에서 또는 차갑게, 하루 또는 그 이상 동안 수행됨으로써 조절되는 것을 특징으로 하는 복합체 생성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, H₂O₂-포획제의 양이 사용된 SOD에 의해 형성된 H₂O₂를 포획하기에 충분한 양이며, H₂O₂-포획제가 퍼옥시다제일 때 퍼옥시다제의 양은 0.01~1 퍼옥시다제 유닛/SOD 유닛, 유용하게는 0.01~0.5 퍼옥시다제 유닛/SOD 유닛인 것을 특징으로 하는 복합체 생성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, SOD와 H₂O₂-포획제와의 복합체, 특히 퍼옥시다제와의 복합체는 0.001~1M의 농도로 존재하는 효소 조인자, 특히 퍼옥시다제 효소 조인자에 의해 안정화되는 것을 특징으로 하는 복합체 생성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 언급된 퍼옥시다제가 고추냉이(horseradish) 퍼옥시다제, 락토퍼옥시다제, 글루타티온 퍼옥시다제 또는 척추(spinal cord)의 퍼옥시다제(또는 글루종-퍼옥시다제:myelo-peroxidase)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 퍼옥시다제 특이적 환원 기질은 바람직

하계는 글루타티온, 페놀, 구아이아콜, 피로갈롤, 메시돌, 3,5-디클로로-2-하이드록시벤젠술폰산 (DCHBS), 아닐린, p-톨루이딘, o-페닐렌 디아민, 메시딘, 아스코르브산, 디하이드록시말레인산, 시토크롬 C, 아이오다이드, 요산, 페놀프탈레인, 2,2'-아지도-디(3-에틸벤조티아졸린-6-술폰)산 (ABTS), 그리고 SCN^- , Cl^- , Br^- 또는 I^- 와 같은 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 복합체 생성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, H_2O_2 -포획제가 식물 퍼옥시다제, 바람직하게는 블랙 래디쉬(black radish)로부터 추출된 것을 특징으로 하는 복합체 생성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 언급된 퍼옥시다제 조인자가 요산, 아스코르브산 또는 디하이드록시말레인산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 복합체 생성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, SOD와 H_2O_2 -포획제와의 복합체, 특히 퍼옥시다제와의 복합체가, 선택적으로 퍼옥시다제 조인자를 갖고, 조 추출물 형태 또는 정제 형태로서 SOD 복합체의 10~50 중량%의 농도로, 적어도 하나의 당, 특히 단당류 또는 이당류, 및/또는 적어도 하나의 폴리올, 특히 50~1000g/mole의 분자량을 갖는 폴리올에 의해 안정화되는 것을 특징으로 하는 복합체 생성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 항-산화제, 유용하게는 친유성 항-산화제, 바람직하게는 토코페놀류 및 그의 유도체, 특히 아세테이트, 리놀레이트 또는 포스페이트와 같은 그의 에스테르류로부터 선택된 항-산화제를 유효 항-산화량으로 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 복합체 생성물.

청구항 13

조성물, 특히 항-유리 라디칼 활성을 갖는 조성물, 예를 들면 화장품, 약품 또는 식품 조성물의 활성 주성분의 하나로서 사용되는 제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에서 정의된 SOD계 복합체의 용도.

청구항 14

조성물, 특히 항-유리 라디칼 활성을 갖는 조성물, 예를 들면 화장품, 약품 또는 식품 조성물에 있어서, 활성 주성분 또는 활성 성분의 하나로서 H_2O_2 -포획제, 유용하게는 퍼옥시다제, 바람직하게는 식물 퍼옥시다제, 더욱 바람직하게는 퍼옥시다제 특이적 환원 기질로 알려진 퍼옥시다제 조인자에 의해 안정화된 슈퍼옥사이드 디스무타제(SOD)를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, SOD의 함량이 조성물 총 중량의 0.01~10 중량%인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서, SOD에 첨가된 퍼옥시다제의 양이 0.01~1 퍼옥시다제 유닛/SOD 유닛, 유용하게는 0.01~0.5 퍼옥시다제 유닛/SOD 유닛인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 퍼옥시다제 효소 조인자가 0.001~1M의 농도로 존재하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 18

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, SOD 또는 SOD와 H_2O_2 -포획제와의 복합체, 특히 퍼옥시다제와의 복합체가, 선택적으로 퍼옥시다제 조인자를 갖고, 조 추출물 형태 또는 정제된 형태로서 SOD 또는 SOD 복합체의 10~50 중량%의 농도로, 적어도 하나의 당, 특히 단당류 또는 이당류, 및/또는 적어도 하나의 폴리올, 특히 50~1000g/mole의 분자량을 갖는 폴리올에 의해 안정화되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 19

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 항-산화제, 유용하게는 친유성 항-산화제, 바람직하게는 토코페놀류 및 그의 유도체, 특히 아세테이트, 리놀레이트 또는 포스페이트와 같은 에스테르류로부터 선택된 항산화제를 최종 조성물의 총 중량의 0.01~3 중량%, 바람직하게는 0.1~1 중량%의 농도로 첨가하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 20

제14항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 언급된 퍼옥시다제가 고추냉이 퍼옥시다제, 랍토퍼옥시다제, 글루타티온 퍼옥시다제, 철주 퍼옥시다제(또는 글루종-퍼옥시다제)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 퍼옥시다제 특이적 환원 기질이 바람직하게는 글루타티온, 페놀, 구아이아콜, 피로갈롤, 메시돌, 3,5-디클로로-2-하이드록시벤젠술폰산 (DCHBS), 아닐린, p-톨루이딘, o-페닐렌 디아민, 메시딘, 아스코르브산, 디하이드록시말레인산, 시토크롬 C, 아이오다이드, 요산, 페놀프탈레인, 2,2'-아지도-디(3-

에틸벤조티아졸린-6-술폰)산 (ABTS), 그리고 SCN^- , Cl^- , Br^- 또는 I^- 와 같은 화합물로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 21

제14항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, SOD는 식물 종자로부터 추출되고, 요산, 아스코르브산 또는 디하이드록시말레인산으로 구성된 퍼옥시다제 조인자를 수반하고, 식물 퍼옥시다제, 바람직하게는 블랙 래디쉬로부터 추출된 식물 퍼옥시다제에 의해 안정화되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, SOD 함량이 조성물 총 중량의 0.1~10 중량%인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, SOD의 양이 조성물 총 중량의 5 중량%인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 24

슈퍼옥사이드 디스뮤타제 또는 SOD를 추출하는 방법에 있어서,

발아단계를 거친 식물 종자를 원료로서 사용하고, 이 발아단계가 그 식물 종자를 수성의 습한 대기 또는 배지에 하루 또는 그 이상 동안 실온에서 접촉시킴으로써, 발아 과정 중 최고의 SOD 활성을 얻고 이 SOD 활성이 최고일 때 SOD 활성을 추출하도록 조절되며,

그 발아된 종자를 갖고, 4~50℃의 온도, 바람직하게는 실온에서 SOD가 추출되기에 충분한 시간 동안, 일반적으로 수 십분~한 시간 이상 동안 수용액으로 추출하고, 여과하고 SOD를 포함하는 여과액을 회수하는 단계를 포함하는 추출 단계를 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 발아단계 이전에 실온에서 또는 차갑게 하루 이상을 수용액 중에서 침적시키는 단계가 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서, 발아단계가 발아 촉진제, 바람직하게는 지베렐린산으로 구성된 발아촉진제의 존재하에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제24항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 침전제로 여과액을 처리하여 프로테아제 또는 리폭시제나 제를 포함한 불필요한 불순물을 제거하고, 비침전된 분획 또는 SOD를 포함하는 상층액을 구성하는 분획을 회수하여 SOD를 더욱 완전하게 정제하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, SOD를 포함하는 비침전 분획의 투석이 바람직하게는 6000~8000 달톤의 차단 역치를 갖는 막으로 용액에 대해 투석하는 것에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 투석된 용액을 크로마토그래피 컬럼으로 추가정제를 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제24항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, SOD가 퍼옥시다제와 같은 H_2O_2 -포획제, 바람직하게는 퍼옥시다제 특이적 환원 기질로 알려진 퍼옥시다제 조인자에 의해 안정화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

제24항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, SOD가 적어도 하나의 당, 특히 단당류 또는 이당류: 및/또는 적어도 하나의 폴리올, 특히 50~1000g/mole의 평균분자량을 갖는 폴리올을 첨가하는 것에 의해 안정화되는 것을 특징으로 하는 방법.